

**ZUR METHODIK DER KININOGENBESTIMMUNG
AM RATTENUTERUS SOWIE
PLASMAKININOGEN- UND HARN-
KALLIKREINGEHALT NACH HITZESCHOCK
BEI RATTEN**

Gertrud Zacherl

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553810_0055

Aus dem Institut für klinische Chemie und klinische Biochemie
der Universität München

Komm. Leiter: Prof. Dr. H. Fritz

ZUR METHODIK DER KININOGENBESTIMMUNG AM RATTENUTERUS
SOWIE PLASMAKININOGEN- UND HARNKALLIKREINGEHALT NACH
HITZESCHOCK BEI RATTEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

vorgelegt von

Gertrud Zacherl

aus
München

1976

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Fritz

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.5.1976



DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
A. THEORETISCHER TEIL	
1. Geschichte des Kallikrein-Kininsystems	2
2. Vorkommen und Eigenschaften von	
2.1 Kallikrein	3
2.2 Kininogen	4
2.3 Kininen	5
3. Möglichkeiten der Aktivierung des Kallikrein-kininsystems	7
4. Pharmakologische Wirkungen der Kinine	9
5. Physiologische und pathophysiologische Wirkungen des Kallikrein-Kininsystems	10
6. Die Verbrennungskrankheit	12
B. EXPERIMENTELLER TEIL	
I. Material und Methoden	
1. Biochemische und physiologische Methoden	
1.1 Meßvorrichtung zur biologischen Kininbestimmung	17
1.1.1 Ansatz der Testlösungen	20
1.1.2 Ansatz des Bradykininstandards	22
1.2 Proteinbestimmung	22
1.3 Elektrophorese	22
1.4 Spektrophotometrische Bestimmung des Harnkallikreins	23

	Seite
2. Tierversuche	
2.1 Das Verbrühungsschockmodell bei Ratten	25
2.2 Entbluten der Versuchstiere	27
2.3 Versuchsanordnung zur Bestimmung des Harnkallikreins bei Ratten	28
II. Ergebnisse	
1. Zur Methodik der Kininogenbestimmung am Rattenuterus	
1.1 Stabilisierung des Bradykininstandards	29
1.2 Präzision der Rattenuterusmethode	32
1.3 Stabilität der Proben	33
1.4 Optimale Inkubationszeit und Enzymmenge	34
1.5 Die Hemmung von Trypsin mit Trasylol	36
2. Ergebnisse der Verbrühungsversuche bei Ratten	
2.1 Kininogengehalt im Plasma	37
2.2 Proteingehalt im Plasma	40
2.3 Elektrophorese der Plasmaproteine	41
2.4 Harnkallikreingehalt im 24-Stundenurin	44
C. DISKUSSION	
1. Zur Methode	46
2. Zu den Ergebnissen	48

D. ZUSAMMENFASSUNG

52

E. LITERATURVERZEICHNIS

53

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Verbrennungen aller Schweregrade ereignen sich täglich bei Unfällen auf der Straße, am Arbeitsplatz und im Haushalt. Die Hitzeeinwirkung auf das Gewebe führt zu schwersten pathophysiologischen Veränderungen, die als "Verbrennungskrankheit" bezeichnet werden. Die erste Phase ist durch Wasser-, Elektrolyt- und Plasmaverlust in das verbrannte Gebiet und das übrige Gewebe gekennzeichnet; es kommt zur Kreislaufinsuffizienz und Sauerstoffmangelversorgung wichtiger Organe, in schweren Fällen kann sich ein Schock ausbilden.

Als Ursache für die alle Organe befallenden Schädigungen wird u.a. die Freisetzung von humoralen Mediatoren wie Histamin, Serotonin oder Kininen und der vermehrte Anfall von proteolytischen Enzymen diskutiert.

Aufgabe dieser Untersuchung war es, die mögliche Beteiligung des Kallikrein-Kininsystems bei der Verbrennungskrankheit zu erfassen, durch die Veränderungen des Kininogengehalts im Plasma und der Kallikreinausscheidung im Harn von verbrühten Ratten.

A. THEORETISCHER TEIL

1. Geschichte des Kallikrein-Kininsystems

1925 entdeckte der Chirurg FREY im Urin eine hochmolekulare, bludrucksenkende Substanz, die zunächst als Kreislaufhormon angesprochen wurde (1). 1930 wurde diese Substanz auch in der Bauchspeicheldrüse nachgewiesen (2) und nach dem griechischen Wort "Kallikreas" für Bauchspeicheldrüse Kallikrein genannt. WERLE entdeckte das Vorkommen von Kallikreinen in Speicheldrüsen (3), Niere, Darm und Plasma (4).

Der enzymatische Charakter von Kallikrein wurde von WERLE et al. (5) 1937 durch die Entdeckung des Polypeptids Kallidin erkannt, das durch Kallikrein aus der α_2 -Globulinfraktion des Plasmas freigesetzt wurde. Dieses Globulin erhielt den Namen Kallidinogen. ROCHA E SILVA konnte 1949 (6) aus diesem Kallidinogen mit Trypsin ein Polypeptid liberieren, das mit Kallidin identisch zu sein schien. Es wurde Bradykinin genannt und erwies sich nach Aufklärung der Aminosäuresequenz als Nonapeptid, Kallidin als Dekapeptid.

Bei der Aufarbeitung von angesäuertem Plasma wurde ein drittes Kinin (7) gefunden, das aus 11 Aminosäuren bestand und als Methionyl-Lysyl-Bradykinin bezeichnet wurde.

2. Vorkommen und Eigenschaften

2.1 Kallikrein

Kallikrein gehört zur Gruppe der Peptidpeptidesterasen und ist wie das Trypsin ein Serinenzym. Das am besten untersuchte Kallikrein aus Schweinepankreas kommt sehr wahrscheinlich in zwei Präenzymformen vor, genannt A und B (8). Die beiden daraus freisetzbaren aktiven Formen unterscheiden sich nur im Kohlehydratanteil.

Kallikrein ist eine streng spezifische Protease. Das einzige natürliche Substrat, das angegriffen wird, ist das Kininogen, wobei die Peptidbindung zwischen Methionin und Lysin und zwischen Arginin und Lysin gelöst wird. Dabei setzen Organkallikreine vorwiegend Kallidin frei, das Plasmakallikrein Bradykinin.

Kallikreine sind im Körper weit verbreitet und können in Organkallikreine und Plasmakallikreine unterteilt werden. Organkallikreine kommen z.B. vor in der Speicheldrüse (9), im Pankreas, Schweiß (10), in Tränen (11) und Nieren (12).

Plasmakallikrein wird als inaktives Präkallikrein in der Leber synthetisiert und besitzt ein höheres Molekulargewicht als die Organkallikreine (13). Das Vorkommen von zwei verschiedenen Präkallikreinen wird diskutiert.

2.2 Kininogen

Das Plasma von Säugetieren und vom Menschen enthält zwei Typen von Kininogen mit unterschiedlichem Molekulargewicht und unterschiedlichem Verhalten gegenüber Kallikreinen.

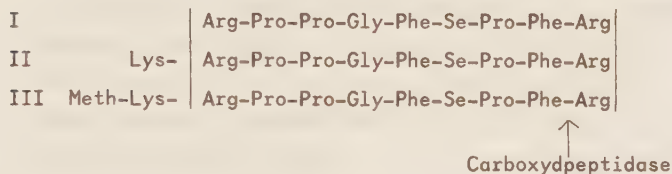
Verschiedene Arbeitsgruppen isolierten und charakterisierten Kininogene vom Menschen, von Rind, Meerschweinchen und Ratte (14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24). Die beiden Kininogenarten werden heute als HMW- und LMW-Kininogen bezeichnet.

Noch HABERMANN nahm an, daß HMW-Kininogen ein artefizielles Dimer des LMW-Kininogen sei (25). Dies kann jedoch heute zumindest für Rinderkininogen widerlegt werden, da sich beide in ihrer Aminosäurezusammensetzung unterscheiden, ebenso wie in ihrem Kohlehydratanteil und ihrer Spaltbarkeit für Plasmakallikrein (14, 15, 16). Immunologisch verhalten sie sich allerdings gleich.

Als Bildungsort für die Kininogene wird die Leber angenommen, außer im Serum kommen sie noch in praktisch allen Organen vor, am konzentriertesten in der Lunge.

2.3 Kinine

Kinine gehören zu den Gewebshormonen, d.h., sie gelangen nicht als Produkt einer innersekretorischen Drüse auf dem Blutwege zum Erfolgsorgan, sondern sie üben in nächster Umgebung des Ortes ihrer Freisetzung ihre Wirkung aus.



Die drei Kinine

I = Bradykinin
II = Kallidin
III = Meth-Kallidin

Der Abbau erfolgt durch Kininasen des Plasmas (Carboxypeptidase N und eine weitere Peptidase) zu inaktiven Polypeptiden.

Die pharmakologischen Wirkungen der Plasmakinine unterscheiden sich nur in quantitativer Hinsicht. Je weiter die Kette über das Aminoende hinaus verlängert ist, desto stärker ist die permeabilitätserhöhende Gefäßwirkung und die blutdrucksenkende Wirkung, desto geringer ist aber die Erregung der glatten Muskulatur (27).

Erregung glatter
Muskulatur:

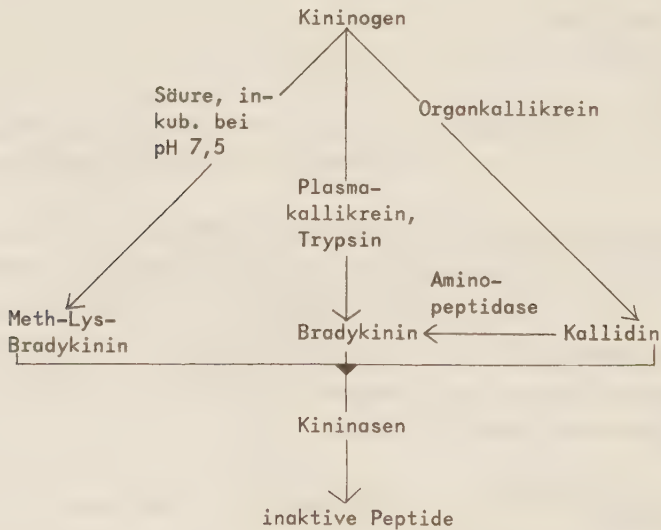
BK > Lys-BK > Meth-Lys-BK

Blutdrucksenkend und
Permeabilität erhöhend:

Meth-Lys-BK > Lys-BK > BK

Der Bradykininspiegel im venösen Blut beim Menschen, gemessen mit radioimmunologischen Methoden, beträgt ca. 0,2 ng/ml (28). Die Halbwertszeit im zirkulierenden Blut liegt unter 15 sec (29), da Inaktivierung oder Verlust in die extravasalen Kompartments in kurzer Zeit erfolgt.

Bei Versuchen mit entbluteten, mit Tyrode' Lösung perfundierten Ratten, denen man arteriell Bradykinin injizierte und 4 min später auf der venösen Seite Blut entnahm, fand man nur noch 0,15 % der injizierten Bradykininmenge wieder (30). Der Hauptanteil wurde in der Lunge abgebaut, dort kommen die Kininasen in hoher Konzentration vor.



Schema 1: Beziehungen zwischen Kininogen, Kininen und ihren Abbauprodukten

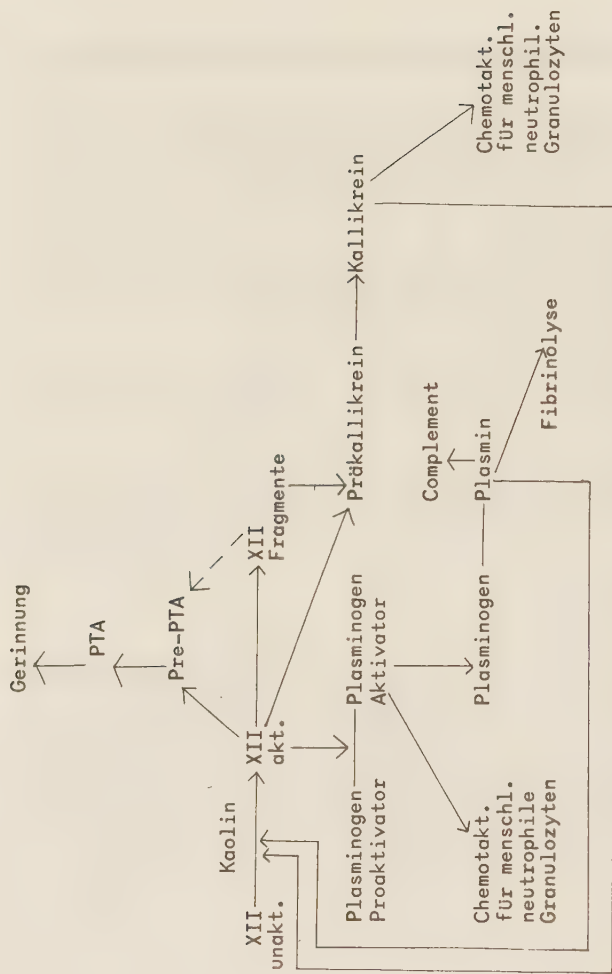
3. Möglichkeiten der Aktivierung des Kallikrein-Kininsystems

Plasmapokine können, analog dem Blutgerinnungssystem, durch Intrinsic- und Extrinsic-Faktoren gebildet werden. Eine zentrale Rolle spielt dabei Faktor XII (Hagemannfaktor) der Blutgerinnungskaskade, der als Initiator der Blutgerinnung, der Fibrinolyse, der Plasmapokinbildung und auch der Complementreaktionen angesehen werden kann.

Die Querverbindungen zwischen den einzelnen Systemen soll Schema 2 veranschaulichen.

Die Aktivierung des Hagemannfaktors erfolgt hauptsächlich durch Oberflächenkontakt, wie er bei Gefäßschäden, Traumen, Noxen und Zellzerstörungen, z.B. bei Verbrennungen, gegeben ist.

Ausgedehnte Zelluntergänge führen zu einer gesteigerten Freisetzung proteolytischer Enzyme und damit zur Freisetzung von Kininen. Auch eine Erniedrigung des pH, z.B. im entzündeten Gewebe oder als Folge einer mangelhaften Sauerstoffversorgung, kann zur Aktivierung des Präkallikreins führen (32).



Schema 2: Verbindungen zwischen Gerinnung, Fibrinolyse, Complementsystem und Kallikrein-Kininsystem (nach Austen, 31)

4. Pharmakologische Wirkungen der Kinine

Kinine können nach LEWIS (33) alle Zeichen der Entzündung - rubor, dolor, calor, tumor, functio laesa - hervorrufen. Sie erweitern die Kapillaren und Arteriolen, bewirken Blutdruckabfall, dagegen werden die Pulmonalgefäße verengt (34). Schon in geringen Konzentrationen vergrößern sie die Permeabilität der Kapillaren (35) und wirken chemotaktisch auf Leukozyten (36).

Kinine bringen die glatte Muskulatur von Darm und Uterus zur Kontraktion, relaxieren aber das Rattenduodenum und -coecum. Außerdem ist bekannt, daß Kinine aus dem Nebennierenmark Katecholamine freisetzen (37), wobei 1 Molekül Bradykinin 5000 Moleküle Adrenalin freisetzt.

Die Pain-Producing-Substance (PPS), eine der am stärksten wirksamen schmerzauslösenden endogenen Substanzen, erwies sich als mit Bradykinin identisch (38).

Die pharmakologischen Wirkungen halten wegen der schnellen Inaktivierung der Kinine nur kurz an.

5. Physiologische und pathophysiologische Wirkungen der Kinine und Kallikreine

Eine Funktion des Pankreaskallikreins für die Darmperistaltik oder die Resorption von Verdauungsprodukten erscheint möglich. Das dafür notwendige Eindringen des Kallikreins in die Darm-schleimhaut konnte mit markiertem Kallikrein nachgewiesen werden (39). Auch eine beschleunigte Resorption von Glukose durch Kallikrein wurde nachgewiesen.

Beim Geburtsvorgang kommt es zur Freisetzung von Kininen, die eine Adaption des Neugeborenenkreislaufs an das extrauterine Leben ermöglichen sollen (40).

Unterschiedliche Formen der Hypertonie zeigen ganz bestimmte typische Veränderungen des Kallikrein-Kininsystems. So ist

- a) bei essentieller Hypertonie sowie bei einigen Patienten mit renaler Hypertension die Ausscheidung von Harnkallikrein subnormal,
- b) beim primären Aldosteronismus und bei einigen Patienten mit Phäochromozytom die Harnkallikreinausscheidung deutlich erhöht,
- c) bei normalen Kindern, deren Eltern an einer Hypertonie leiden, die Harnkallikreinausscheidung zur Höhe des Blutdruckes der Eltern umgekehrt proportional und diese Veränderungen sind familiär kumuliert,
- d) bei Normalpersonen durch Na^+ Entzugsdiät eine vermehrte Harnkallikreinausscheidung zu provozieren (41).

Die Rolle der Kinine im Entzündungsgeschehen ist eng mit den Prostaglandinen verknüpft, deren Wirkung durch Kinine verstärkt wird.

Die Bedeutung des Kallikrein-Kininsystems im chirurgischen Streß veranschaulicht die Beobachtung, daß der Präkallikrein- und Kininogengehalt des Plasmas während der ersten 2-4 Stunden nach Beginn der Operation auf 55 bis 60 % der präoperativen Werte absinkt und erst am 3. bis 4. postoperativen Tag wieder auf normale Werte ansteigt (42).

Auch bei extracorporaler Zirkulation in der Herzchirurgie wird als Folge der Kontaktaktivierung eine starke Abnahme des Kininogenspiegels beobachtet. Eine Behandlung der Patienten mit Trasylol^R verhinderte den Abfall des Kininogens (43).

Im Lebervenenblut von Patienten mit Carcinoidsyndrom fand man im Anfall erhöhte Spiegel an Bradykinin, wobei die Menge an freigelegtem Kinin zur Schwere des Anfalls in Beziehung stand (44).

In synovialen Ergüssen von Gichtkranken können Kinine nachgewiesen werden (45). Man weiß, daß Uratkristalle Hagemannfaktor zu binden vermögen, der in der Gelenkflüssigkeit vorkommt. Tierexperimentell läßt sich mit Uratkristallen in der Gelenkflüssigkeit Kininbildung hervorrufen.

Beim Dumpingsyndrom stören hypertonische Lösungen, die normalerweise nicht in den Dünndarm gelangen, die normale Schleimhautfunktion. Durch Kontakt mit den hypertonischen Lösungen kann Gewebskallikrein aktiviert und Kinine freigesetzt werden (46). Bei einer infizierten Aortenprothese im Abdomen, die mit Osteoarthropathie, Schmerzen und Schwellung einherging, konnte

MASHFORD (28) mit radioimmunologischen Methoden einen in der Femoralarterie gegenüber der Armarterie erhöhten Kininspiegel nachweisen.

Im septischen Schock konnte gezeigt werden, daß bei den sterbenden Patienten der Kininogenspiegel vor dem Tod auf nicht mehr meßbare Werte abfiel, während bei den überlebenden Patienten der Kininogenspiegel wieder auf normale Werte anstieg (47).

Über die Beziehungen des Systems zu den verschiedenen Schockformen und zur Verbrennung wird in der Diskussion und im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

6. Die Verbrennungskrankheit

Nach einer durch thermische Überhitzung ausgelösten Gewebsläsion kommt es zu einer Kettenreaktion von krankhaften Vorgängen, von ARTURSON auch als "burn syndrom" bezeichnet. Die auftretenden Symptome lassen sich in drei zeitlichen Phasen aufzeigen:

I. Phase

In den ersten 48 Stunden kommt es durch verletzte Gefäße und ansteigende Gefäßpermeabilität zu einer starken Flüssigkeitsverschiebung und so zur akuten zirkulatorischen Insuffizienz, von der das gesamte Organsystem betroffen ist, zum Schock. Zahlreiche Organe erscheinen ödematös und mit Hämorrhagien durchsetzt. Es kommt zum Lungenödem (48), Nierenrindennekrose (49) mit Oligo- oder Anurie, Leber-

zellnekrosen (50), Gastrointestinalulcerationen (50) und Gehirnödem.

II. Phase

Am dritten bis achten Tag nach der Schädigung stellen sich weitere Eiweiß- und Elektrolytverluste ein, es entstehen Infekte und degenerative Veränderungen an den Organen.

III. Phase

In der zweiten Woche nach der Verbrennung kommt es zu größeren Organatrophien mit beginnender fibrotischer Reparation vor dem Hintergrund einer Stoffwechselentgleisung, Infektion und allgemeiner Erschöpfung.

Lokales Geschehen

Die biochemischen und morphologischen Veränderungen sind abhängig von Zeitdauer und Temperatur der lokalen Hitzeeinwirkung (52), d.h., auch eine geringe Hitzeeinwirkung kann bei längerer Einwirkungsdauer zu großen Schäden führen.

Am Ort der Verbrennung kommt es zur lokalen epidermalen Nekrose, zum Zelluntergang und zur teilweisen oder völligen Zerstörung von Eiweißmolekülen.

Die Dermis verändert sich durch sofortige Konstriktion der kleinen Arterien, gefolgt von Vasodilatation, und Erhöhung der Kapillarpermeabilität. Es kommt zur Verschiebung von Plasma und Plasma-

eiweißen vom intravasalen in den interstitiellen Raum, zum typischen Verbrennungsödem. Durch Kontakt des Plasmas mit der traumatisierten Oberfläche wird der Hagemannfaktor aktiviert und setzt die Enzymkaskade von Schema 2 in Gang.

Durch den massiven Zelluntergang in der nekrobiotischen Zone werden proteolytische Enzyme, Proenzyme und Polypeptide freigesetzt, die über den interstitiellen Raum und das Lymphsystem in den Blutkreislauf gelangen und so ihre Wirkung im ganzen Organismus entfalten können.

Die zunehmende Kapillarpermeabilität kann außer von Kininen noch durch Freisetzung von Serotonin, Histamin und Prostaglandinen bewirkt sein. Dabei sollen die Prostaglandine einen lokalen Permeabilitätseffekt für Histamin, Bradykinin und Serotonin aufweisen (53).

Allgemeine Folgen

Die aus der allgemeinen Erhöhung der Gefäßpermeabilität resultierende Hypovolämie führt zu den Symptomen des Kreislaufschocks, d.h. zu ungenügender Gewebssperfusion, vermindertem Sauerstoffangebot und Blutdruckabfall. Die vermehrte Ausschüttung von Katecholaminen bewirkt eine Kreislaufzentralisation.

Der Anstieg von Hämatokrit und Viskosität des Blutes zeigt den hohen Wasserverlust in das Wundgebiet, das Gewebe und die starke Verdunstung an der verbrannten Haut an.

Im Plasma sind als weiterer Ausdruck der Zellschädigung erhöhte Transaminasen, erhöhtes Kalium und ein ansteigender Lactatspiegel nachzuweisen. Es kommt zu Plasmaeiweißverlusten und als Aus-

druck des akuten Nierenversagens zum Anstieg des Serumharnstoffspiegels (52).

Über die primär gestörte Makrozirkulation kommt es dann durch intravasale Aggregation von Erythrozyten und Thrombozyten sowie Gerinnung zu Störungen der Mikrozirkulation und Minderdurchblutung nachgeschalteter Organabschnitte (54).

Die unzureichende Sauerstoffversorgung des Gewebes führt zum Anstieg des Lactatspiegels, der pH des Blutes sinkt ab. Diese Lactacidose stimuliert das Nebennierenmark, wodurch vermehrt Adrenalin ausgeschüttet wird (55). Die dadurch bedingte Gefäßverengung steigert noch das Sauerstoffdefizit des Gewebes.

Bei den geschilderten pathophysiologischen Veränderungen der Verbrennungskrankheit kommt dem Kallikrein-Kininsystem eine entscheidende Bedeutung zu.

Ödembildung, Steigerung der Kapillarpermeabilität, Blutdruckabfall und Aktivierung der Gerinnungskaskade als einige Folgen der Verbrennung lassen sich u.a. mit den Wirkungen der Kinine in Einklang bringen und auf einen erhöhten Plasmakininspiegel schließen. Nun ist die Plasmakininkonzentration das Ergebnis verschiedener Faktoren:

- a) Des Aktivierungszustandes der kininbildenden Enzymkaskade
 - b) Der Aktivität der Kallikreininhibitoren
 - c) Der Verfügbarkeit an Substrat, des Kininogens
 - d) Der Aktivität der kininabbauenden Enzyme, der Kininasen
- (56).

Bei der Verbrennung wird durch vermehrten Oberflächenkontakt des Plasmas der Hagemannfaktor und damit das Präkallikrein aktiviert, die freigelegten proteolytischen Enzyme wirken direkt auf das Plasma-Kininogen und setzen ebenfalls Kinine frei (57).

Das körpereigene Plasmainhibitorsystem, α_1 -Antitrypsin, α_2 -Makroglobulin und C $\bar{1}$ -Esterase, hemmt bis zu einem bestimmten Umfang das enzymatische Geschehen. Erreicht jedoch die enzymatische Kettenreaktion einen zu großen Umfang, reichen die vorhandenen Inhibitoren nicht mehr aus, es kommt zur enzymatischen Entgleisung und zur vermehrten Enzymfreisetzung.

In der vorliegenden Arbeit wurde als weiterer wichtiger Parameter für die Plasmakininkonzentration der Kininogenspiegel im Plasma von verbrühten Ratten gemessen. Der zur Kininogenbestimmung (gemessen wurde die freigelegte Menge Bradykinin) zur Verfügung stehende Bioassay wurde in den Einzelschritten überprüft und versucht, ihn so zu optimieren, daß die Ergebnisse genau und reproduzierbar sind.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

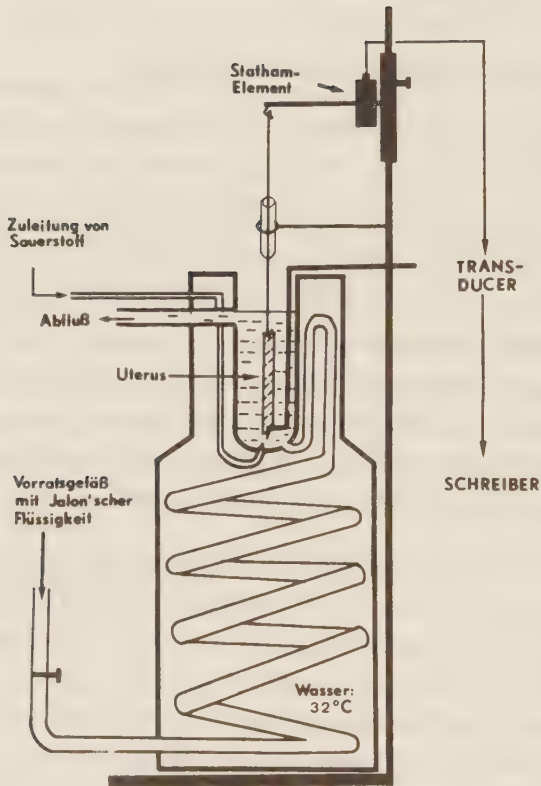
I. Material und Methoden

1. Biochemische und physiologische Methoden

1.1 Meßvorrichtung zur biologischen Kininbestimmung am Rattenuterus -----

Weibliche jungfräuliche Ratten vom Stamm Sprague Dawley, Gewicht 180 bis 250 g, werden etwa 12 Stunden vor Beginn des Testes mit 0,05 ml Cyren B forte^R (Diäthylstilböstroldipropionat, Bayer) i.m. gespritzt, in einem Käfig ad libitum mit Wasser und Altruminstandardfutter versorgt und dann mit Genickschlag getötet. Der Uterus wird entnommen und bis zur Verwendung in physiologischer Kochsalzlösung bei etwa 4 °C aufbewahrt.

Der Uterus wird sorgfältig ohne Verletzung von den Adnexe befreit und nach Entfernung der beiden Enden das etwa 1,5 cm lange Mittelstück eines Horns verwendet. Wie Abb. 1 zeigt, wird der Uterus mittels dünner Glasstäbe in das Gewebebad eingebracht und locker hängend zwischen den am Statham-Element und Stativ befestigten Glasstäben eingespannt. Der Uterus wird von Jalon'scher Lösung von 32 °C umspült und Sauerstoff feinperlend mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 10 bis 12 l/Stunde zugeführt. Die Übertragung erfolgt über ein Statham-Element, die Vorspannung beträgt etwa 2 bis 2,5 g. Die Verstärkung auf den Schreiber erfolgt mit 20 V. Schreibergeschwindigkeit 5 mm/min.



Meßvorrichtung zur biologischen Kininbestimmung

Abb. 1 MESSVORRICHTUNG ZUR BIOLOGISCHEN
KININBESTIMMUNG

Die Applikation von Probe und Standard (Bradykininstandardlösung) erfolgt mit Hamilton-Mikroliterspritzen, in einem Intervall von drei Minuten. Nach jeder Probe wird viermal mit Jalon'scher Lösung gespült. Als Maß für die applizierte Dosis hat sich in unserem System der diastolische Tonus zwischen der ersten und zweiten Kontraktion als der beste Parameter erwiesen.

Der Meßbereich liegt je nach Uterus zwischen 1 bis 4 ng Bradykinin. Eine Unterscheidung von 0,2 ng ist bei entsprechender Uterusempfindlichkeit sicher möglich.

Die durchschnittliche Latenzzeit beträgt 30 sec, die Kontaktzeit maximal 90 sec, die Ruhezeit ca. 90 sec. Die Dosis der Probe muß so gewählt werden, daß der Spike innerhalb des engen Meßbereiches entsteht.

Bemerkungen zur Technik

Die früher verwendeten Tuberkulinspritzen wurden durch Hamilton-Mikroliterspritzen (Hamilton Bonaduz AG, Schweiz) ersetzt, wodurch Applikationsmengen im μl -Bereich möglich wurden. Mit größeren Spritzen wird der Kammerinhalt stärker verdünnt, dadurch kommt es zu

- a) Ionenstärkeveränderung,
- b) Temperaturveränderung,
- c) pH-Veränderung,

Parametern, die die Uteruskontraktion zusätzlich beeinflussen können.

Ein dosisabhängiger unterer Umkehrpunkt ist nur nach der ersten Kontraktion gegeben. Spritzt man zuviel von Probe oder Standard (Tuberkulinspritzen lassen sich erst ab 10 μl genau dosieren,

Hamiltonspritzen ab 1 μ l), registriert der Schreiber nur den diastolischen Umkehrpunkt der zweiten oder sogar dritten Kontraktion, die eine stärkere diastolische Relaxation als die erste Kontraktion haben. Der dosisabhängige erste Umkehrpunkt wird vom Schreiber nicht erfaßt, da er außerhalb des engen Meßbereiches liegt. Ein Maß für dieses "Überspritzen" des Uterus ist auch die Latenzzeit: Verlängert sie sich, registriert der Schreiber wahrscheinlich erst den zweiten Umkehrpunkt.

Jalon'sche Lösung:

90 g NaCl

4 g KCl

5 g NaHCO_3

0,6 g CaCl_2

1 mg Atropin

1 mg Atropin = 0,1 μ g Atropin/ml

in 10 l Aqu.dest gelöst, pH 9,5.

1.1.1 Ansatz der Testlösungen zur Bestimmung des Kininogengehalts im Plasma

Als beste Methode hat sich nach den Voruntersuchungen die von TRAUTSCHOLD und WERLE 1965 mod. Methode von DINIZ und CARVALHO erwiesen (58).

Prinzip:

Durch Erhitzen auf 98 °C und Ansäuern werden im Plasma Kininasen, Kininogenasen und α_1 -Antitrypsin zerstört und im denaturierten Plasma mit einem Trypsinüberschuß aus den Plasmakininogenen Kinine freigelegt, deren Menge am Ratten-

uterus bestimmt wird. Der Kininogengehalt des Plasmas wird in Kininäquivalenten ausgedrückt.

0,2 ml Plasma werden mit 5,0 ml 1/10-n Essigsäure vermischt und 30 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlung Zugabe von 1,5 ml 0,3 M Trispuffer pH 7,8 und Einstellen des pH der Lösung auf 7,8. Nach Zugabe von 0,5 ml Trypsinlösung und 2 mg Bycomycin^R wird das Gemisch 25 min bei 37 °C inkubiert. Das Trypsin wird mit 0,4 ml Trasylol^R und weiterer Inkubation bei 37 °C 10 min inhibiert. Anschließend kann die Lösung sofort am Rattenuterus gegen synth. Bradykinin ausgetestet werden oder bei -20 °C tiefgefroren bis zu sieben Tagen aufbewahrt und dann getestet werden.

Reagenzien:

a) 1/10-n Essigsäure

Essigsäure 96 %, Merck, MG 60,05 = 15,99 M Lösung
5,9 ml zu 1000,0 mit Aqu.dest. lösen.

b) Trypsinlösung

1 mg Trypure Novo (Novo)
in 1 ml Aqua dest. lösen, frisch zubereiten.

c) 0,3-M Trispuffer pH 7,85

Tris (Hydroxymethyl) aminomethan Merck MG 121,14
36,34 g Tris zu 1000,0 in Aqua dest. lösen und auf pH 7,8 einstellen

d) Trasylol^R (Bayer)

Kallikreininhibitor aus Rinderorganen
1 Ampulle enthält 100 000 KIE/10 ml.

1.1.2 Ansatz des Bradykininstandards

Bei der Verdünnung der synthetischen Bradykininlösung erhielten wir instabile Lösungen. Wie die Voruntersuchungen ergaben, war folgender Ansatz über Tage stabil:

20 µl BK in 10 ml NaCl 0,9 % steril in den vorher behandelten Plastikgefäßen lösen, Zugabe von 2 mg Bycomycin^R.

Reagenzien

a) Synth. Bradykininlösung, Fa. Sandoz, Basel

1 ml = 0,09 mg BK

b) Bycomycin^R (Byk-Gulden, Charg. Nr. 180)

1.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte im frischen Plasma nach der Biuretmethode (59) mit dem Merck Reagentiensatz Nr. 3327 zur Gesamteiweißbestimmung. Die Extinktion wurde im Eppendorf Photometer bei 546 nm gemessen.

1.3 Elektrophoretische Auftrennung der Rattenplasmaproteine

Spätestens einen Tag nach der Gewinnung wurde das Plasma dreimal mit dem Serumstempel auf die Celluloseacetatfolie aufgetragen und 45 min bei 300 V aufgetrennt. Die Färbung erfolgte 5 min im Amidoschwarz-Färbegrad, anschließend Entfärbung in Methanol-Eisessig. Das Transparenzbad wirkte etwa 5 min bis zur Durchsichtigkeit der Folie ein, anschließend Trocknen bei 90 bis 95 °C. Die Auswertung erfolgte am Zeiss mit Integralschreiber.

Material:

- a) Cellulose-Acetatpapier
- b) Veronal-Na Puffer pH 8,6
- c) Amidoschwarzlösung
- d) Entfärbebad: Methanol-Eisessig 9:1
- e) Transparenzbad: Dioxan-Isobutanol 7:3

1.4 Spektrophotometrische Bestimmung des Harnkallikreins

Es wird die Spaltungsgeschwindigkeit von N-Benzoyl-L-arginin-äthylester (BAEE) nach folgender Reaktionsgleichung gemessen:



Die Bestimmung erfolgt nach der Methode von TRAUTSCHOLD und WERLE (60), modifiziert von HEUTELBACH (61).

Der 24-Stundenurin der Versuchstiere wird 12 Stunden in dest. Wasser dialysiert. 1 ml Dialysat wird mit 0,02 ml Trasylol^R (200 KIE) versetzt. In zwei Küvetten, Schichtdicke 1 cm, wird pipettiert:

- 0,02 ml ADH
- 2,4 ml Pyrophosphatpuffer
- 0,5 ml BAEE Lösung
- 0,1 ml NAD⁺ Lösung

Die Ansätze werden 5 min bei 25 °C inkubiert, in

Küvette I 0,02 ml Dialysat-Trasylolgemisch

Küvette II 0,02 ml Dialysat

pipettiert, 2 min inkubiert und die Extinktionsänderung der beiden Küvetten während 10 min bei 25 °C mit einer Wellenlänge von 366 nm bestimmt.

Berechnung:

$$\text{Aktivität} = \Delta E / \text{min} \cdot \frac{10^6 \cdot \text{Vol/E}}{\epsilon \cdot d \cdot \text{Vol A}} \quad \text{mU/ml}$$

Vol A: Volumen vor der Dialyse

Vol E: Volumen nach der Dialyse

Reagenzien:

- a) Nicotinamid-adenin-dinucleotid, Boehringer-Mannheim
20 mg NAD^+ werden in 1 ml Aqua dest. gelöst, 2 Tage haltbar.
- b) N-benzoyl-L-argininäthylester, Merck
1 mg BAEE wird in 1 ml Aqua dest. gelöst, 1 Tag haltbar.
- c) Alkoholdehydrogenase, Kristallsuspension, Boehringer-Mannheim.
- d) Pyrophosphatpuffer pH 8,7
15,2 g Natriumpyrophosphat
4,1 g Semicarbazid
0,9 g Glycin
ad 500,0 mit Aqua dest. lösen und auf pH 8,7 einstellen.
- e) Trasylol^R, Bayer
Kallikreininhibitor aus Rinderorganen
1 Ampulle enthält 100 000 KIE/10 ml

2. Tierversuche

2.1 Das Verbrühungsschockmodell bei Ratten

Zur Erzielung eines Verbrennungstraumas sind in der Literatur verschiedene Modelle beschrieben:

- Verbrennung mit Brandeisen (62),
- Verbrennung mittels Lichtbogen (63),
- Verbrennung mittels Bunsenbrennerflamme (64),
- Verbrühung mit heißem Wasser
(MCCARTHY, 1945, ARTURSON 1964, 65, 66, 52).

Als gut reproduzierbares, mit relativ geringem labortechnischen Aufwand durchführbares Überhitzungsschockmodell wählten wir die von MCCARTHY entwickelte Methode der "back burn procedure", die 1964 von dem schwedischen Spezialisten für Verbrennungskrankheiten, ARTURSON, weiter standardisiert wurde.

Die Extremitäten bleiben bei dieser Methode funktionsfähig, direkte Hitzeeinwirkung auf Bauch und Därme wird vermieden und die Funktion der Ausscheidungsorgane ist nicht beeinträchtigt.

Bei den Versuchen wurden weibliche jungfräuliche Ratten (Sprague-Dawley), Gewicht 180 bis 200 g, verwendet. Bis 24 Stunden vor der Verbrühung erhielten die Tiere Altrumin-Standardfutter, Wasser ad libitum. Nach der Verbrühung wurden die Ratten in durchsichtigen Makrolon^R Einzelkäfigen gehalten, um Kannibalismus zu verhindern. Die Verbrühung des Rückens der Ratte wurde bei konstanter Temperatur von $93^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ in einem Laborwasserbad vorgenommen.

Der Zusatz von Detergentien stellte eine gleichmäßige Benetzung sicher, die Wassertemperatur wurde mittels Thermostat und Umwälzanlage konstant gehalten.

Etwa 45 min vor dem Versuch wurden die Tiere mit Chloralhydratlösung 3,6 % (1 ml/100 g Ratte) anaesthetisiert. Das Chloralhydrat wurde mit 5 ml physiol. Kochsalzlösung steril verdünnt und intraperitoneal gespritzt. MCCARTHY und LOEW (65, 67) benutzten Äther als Anaesthetikum, wobei eine genaue Kontrolle der Applikationsmenge nicht möglich ist.

Die Tiere wurden dann mit einem elektrischen Scherapparat am Rücken und bis auf einen schmalen Streifen auch am Bauch geschoren, anschließend mit Pilca^R enthaart. In umfangreichen Vorversuchen haben wir festgestellt, daß ein zusätzliches Enthaaren mit Pilca^R nach dem Scheren für eine exakte Reproduzierbarkeit notwendig ist, da sich in dem feinen, nach der Rasur verbleibenden Haarpolster Luftblasen festsetzen, die wie eine Isolierschicht wirken.

Die Verbrühungsmethode nach MCCARTHY läßt keine genau kontrollierbare Eintauchtiefe zu, deshalb gingen wir nach folgendem Verfahren vor:

Die Ratte, an Vorder- und Hinterfüßen mit Leukoplast^R gefesselt, wurde auf eine gebogene Kramerschiene gespannt, der Kopf mit Leukosilk^R hochgebunden und der Schwanz zwischen den Hinterfüßen durchgezogen. Die Eintauchtiefe wurde mittels anatomischer Merkmale der Tiere kontrolliert, die Kramerschiene mußte sich gerade noch über der Wasseroberfläche befinden. So wurde ein konstantes Verbrennungsareal von ca. 38 % erreicht.

Die Gesamtoberfläche wurde nach der Formel von Lee berechnet:

$$A = K \cdot W^{\frac{2}{3}}$$

A = Oberfläche in cm^2

W = Gewicht in g

K = 10

Die Verbrühungsfläche wurde bestimmt, indem der Umfang des verbrannten Areal auf ein Stück entwickelten Röntgenfilm aufgetragen und ausgeschnitten wurde. Mit der Analysenwaage wurde im Verhältnis zu einer bekanntgroßen Vergleichsfläche die cm^2 bestimmt. Die Verbrühungszeit betrug 22 sec, die Überlebensrate etwa 90 %.

2.2 Entbluten der Versuchstiere

Zur Blutgewinnung wurden die Tiere wieder mit Chloralhydrat 3,6% (1 ml/100 g Ratte) i.p. betäubt und die Aorta freipräpariert. Mit heparinisierten Monovetten und Blutentnahmekanülen konnte das Blut sauber und quantitativ gewonnen werden.

Der Vorteil gegenüber dem Dekapitieren der Tiere bestand in der leichten Durchführbarkeit der Methode und der Gewinnung von Blut, das nicht mit verletztem Gewebe in Berührung gekommen war. Verletztes Gewebe kann durch Aktivierung des Hagemann-faktors Plasmakallikrein und Plasmin aktivieren und so den Kininogengehalt des Blutes durch Kininfreisetzung erniedrigen (67).

Das heparinisierte Blut wurde 15 min bei 3000 U/min zentrifugiert und zur Kininogenbestimmung sofort verarbeitet, für die Proteinbestimmung und die Elektrophorese bei 4 °C höchstens einen Tag aufbewahrt.

2.3 Versuchsanordnung zur Bestimmung des Harnkallikreins bei Ratten

14 weibliche, jungfräuliche Ratten (Stamm Sprague-Dawley) wurden in Einzelkäfige gesetzt und erhielten Altruminstandardfutter sowie Wasser ad libitum. Der Harn wurde in Plastikgefäßen gesammelt und bis zur Kallikreinbestimmung bei 4 °C aufbewahrt. Die Sammelperiode betrug 24 Stunden. Zwei Tage lang wurde von jedem Tier die normale Kallikreinausscheidung/24 h im Urin gemessen, dann sieben Tiere nach dem Hitzeschockmodell verbrüht und die sieben Kontrolltiere bis zum Eintauchen ins Wasser ebenso behandelt. An den drei folgenden Tagen wurde wieder der 24-Stunden-Urin gesammelt und die Kallikreinausscheidung gemessen.

II. Ergebnisse

1. Zur Methodik der Kininogenbestimmung am Rattenuterus

1.1 Stabilisierung des Bradykininstandards

Das Trypsininkubat zur Kininogenbestimmung wird am Rattenuterus gegen eine Standardlösung ausgetestet, die durch Verdünnen einer synthetischen Bradykininlösung hergestellt wird.

Zur Überprüfung der Stabilität des BK-Standards wurden 20 µl der BK-Lösung, Sandoz, mit 10 ml Aqua dest. verdünnt, dieser Standard stündlich frisch angesetzt und abwechselnd über sieben Stunden am Uterus getestet. Als Maß für eine identische uteruskontrahierende Wirkung diente der Meßbereich von 6 bis 8 cm bei einer Gesamtschreiberpapierbreite von 10 cm, der diastolische Umkehrpunkt der Kontraktionswelle mußte innerhalb dieses (willkürlich gewählten) Bereiches liegen.

Wie Abb. 2 zeigt, nahm die uteruskontrahierende Wirkung der Bradykininstandardlösung stetig ab. Nach sieben Stunden wurde die vierfache Standardmenge gespritzt, um denselben uteruskontrahierenden Effekt wie zu Beginn des Versuches zu erreichen. Die Instabilität des Bradykinins in Lösung könnte zurückzuführen sein auf

- a) mikrobiellen Befall,
- b) Adsorption .

Um den mikrobiellen Befall auszuschalten, reinigten wir die Plastikgefäße (Verhinderung der Adsorption) gründlich nach folgender Methode,

- 1 Nacht in RBS 25 einweichen
- 5 min Aqua bidest.
- 15 min Chlorhexidingluconatlösung 0,01 %
- 5 min Aqua bidest.,

setzten der Lösung 2 mg Bycomycin^R (Charg. Nr. 180) zu und verwendeten statt Aqua dest. physiolog. NaCl, steril. Dieser Standard wurde wieder stündlich frisch angesetzt und abwechselnd über sechs Stunden am Uterus getestet.

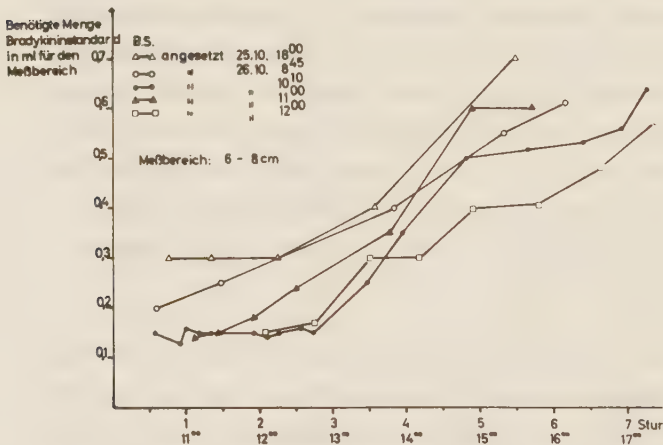


Abb. 2 ÜBERPRÜFUNG DER STABILITÄT DES BRADYKININSTANDARDS IM VERLAUF VON SIEBEN STUNDEN

Abb. 3 zeigt die über Stunden gleichbleibende uteruskontra-
hierende Wirkung der Standardlösung. Auch nach zwei Tagen bei
4 °C hatte die Lösung denselben uteruskontrahierenden Effekt
wie ein frisch angesetzter Standard.

In anderen Arbeitsgruppen wurde eine Stabilisierung mit einem
Oxalsäurezusatz (Endkonz. 10^{-3} M) versucht (68) oder die Stan-
dardlösung jede Stunde frisch angesetzt (69).

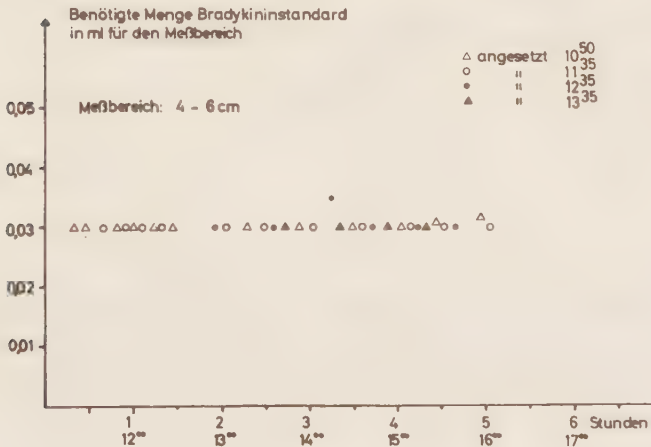


Abb. 3 ÜBERPRÜFUNG DER STABILITÄT DER MODIFIZIERT
ANGESETZTEN BRADYKININSTANDARDLÖSUNG

1.2 Präzision der Rattenuterusmethode

Biologische Meßmethoden haben normalerweise eine hohe Streubreite, deshalb sollte an unserem System die Präzision überprüft werden. Dazu wurde eine Probe am gleichen Tag an vier verschiedenen Uteri getestet.

Uterus	1	2	3	4
<u>ng Bradykinin</u> ml Plasma	585	608	620	675
Mittelwert:	622 $\pm$ 38,2 ng BK/ml Plasma			
Variations- koeffizient	$V_r = \frac{s/\bar{x}}{\sqrt{n-1}} \cdot 100 \quad \% \quad (70)$			
	$V_r = 3,5 \%$ =====			

Wegen des relativ großen labortechnischen Aufwandes wurde dieser Versuch nur einmal angesetzt, aber nach weiteren Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe lag der Variationskoeffizient V_r am Rattenuterus bei mit Urinkallikrein umgesetzten Proben sogar noch unter dem hier gefundenen Wert (2,3 %).

1.3 Stabilität der Kininproben

Um die Haltbarkeit der Proben in tiefgefrorenem Zustand (-20°C) zu ermitteln (eine sofortige Testung am Uterus war nicht immer möglich), wurde ein Ansatz, in 1 ml-Proben aufgeteilt, bei -20°C tiefgefroren und an vier aufeinanderfolgenden Tagen sowie eine Woche später aufgetaut und getestet.

Getestet am:	ng Bradykinin/ml Ansatz:
--------------	--------------------------

8.8.	79,5
------	------

9.8.	78
------	----

10.8.	86
-------	----

11.8.	76,5
-------	------

16.8.	75,8
-------	------

Mittelwert: $79,1 \pm 5,3$ ng BK/ml Ansatz

Der Variationskoeffizient V_x lag mit 3,6 % nur unwesentlich über dem für die Präzision der Methode ermittelten Wert (3,5 %), die Proben konnten also bis zu sieben Tagen bei -20°C aufbewahrt werden.

1.4 Optimale Inkubationszeit und Enzymmenge

Bei der Kininogenspaltung durch Trypsin soll im Enzymüberschuß gearbeitet werden, um die maximal zu liberierende Kininmenge zu erhalten. Um die optimale Enzymmenge zu ermitteln, wurden Proben mit ansteigenden Trypsinkonzentrationen angesetzt, 25 min inkubiert und anschließend am Uterus getestet.

Abb. 4 zeigt, daß mit 0,5 mg Trypsin, der von uns gewählten Konzentration, im Enzymüberschuß gearbeitet und das maximal freisetzbare Bradykinin erfaßt wird. Bei einer weiteren Erhöhung der Trypsinmenge wurde weniger Bradykinin nachgewiesen, eventuell ein Hinweis auf geringste Chymotrypsinbeimengungen.

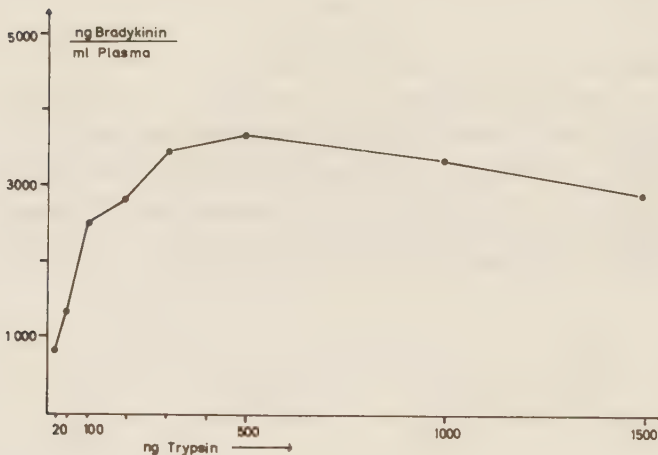


Abb. 4 KININLIBERIERUNG BEI STEIGENDER ENZYMKONZENTRATION

In einem weiteren Vorversuch wurde mit Enzymüberschuß die Inkubationszeit variiert.

Abb. 5 zeigt den minimalen Anstieg der freisetzbaren Kinine bei einer Inkubationszeit von 25 min gegenüber 10 min; eine längere Inkubationszeit hätte also zu keiner wesentlichen Steigerung geführt.

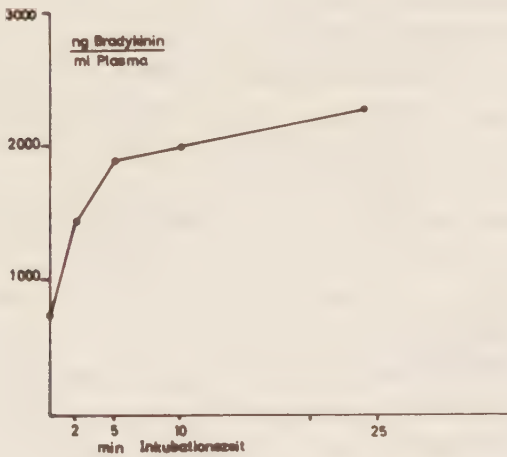


Abb. 5 KININLIBERIERUNG IM ENZYMÜBERSCHUSS BEI VERSCHIEDENEN INKUBATIONSZEITEN

1.5 Die Hemmung von Trypsin mit Trasylol

Trypsin hat schon in geringsten Dosen einen uterusstimulierenden Effekt. In den Trypsininkubaten mußte der Enzymüberschuß also vollständig inhibiert sein.

Es wurden vier Proben aus demselben Plasma angesetzt, mit 500 μ g Trypsin inkubiert und mit

- a) 0,2 ml 2n HCl inaktiviert, 30 min bei 37 °C
- b) 0,2 ml 2n HCl inaktiviert, 10 min bei 100 °C
- c) 0,3 ml Trasylol (3000 KIE) inhibiert, 10 min bei 37 °C
- d) 0,4 ml Trasylol (4000 KIE) inhibiert, 10 min bei 37 °C.

Die Ansätze wurden neutralisiert und in jeder Probe mit der BAEE-Methode die esterspaltende Aktivität untersucht.

Ergebnis: a) 828 mU/ml
b) 398 mU/ml
c) 10 mU/ml
d) 0 mU/ml

Da auch große Trasylolmengen keine uterusverändernde Wirkung haben, wurde mit Trasylolüberschuß (0,4 ml) gearbeitet. Die Gleichgewichtseinstellung zwischen Enzym und Inhibitor erfolgt nicht augenblicklich, beim Arbeiten im Überschuß genügt eine Inkubationszeit von 10 min bei 37 °C (71).

Bei der Messung von nicht genügend inhibierten Trypsininkubaten am Uterus beobachtet man, ebenso beim darauffolgenden Spritzen von Standard, eine Verkürzung der Latenzzeit. Bei den Proben mit 0,4 ml Trasylol ergab sich, auch bei nachgespritztem Standard, keine Veränderung der Latenzzeit.

2. Ergebnisse der Verbrühungsversuche bei Ratten

2.1 Kininogengehalt im Plasma

Es wurden etwa 120 Ratten nach dem beschriebenen Verfahren verbrüht und nach bestimmten Zeiten entblutet.

Mit der angewandten Bestimmungsmethode betrug der Kininogengehalt, ausgedrückt in ng freigesetztem Bradykinin pro 100 mg Protein, im Plasma von unbehandelten Tieren

3810 ± 537 ng BK/100 mg Protein ($n = 20$).

Abb. 6 zeigt den zeitlichen Verlauf der Änderungen des Kininospiegels nach Verbrühungsschock.

Innerhalb der ersten Stunde nach der Verbrühung sinkt der Kininogengehalt auf 65 % des Normalwertes ab, steigt dann wieder an, verbleibt bis zur 20. Stunde im Normalbereich und steigt dann steil bis zum dreifachen der Norm an. Am vierten Tag erfolgt eine weitere Steigerung der Kininogenkonzentration, dann ein Abfall auf den doppelten Normwert, der noch nach 20 Tagen nachzuweisen ist.

Faßt man die Entblutungszeiten zu übersichtlichen Zeiträumen zusammen (Abb. 7), so fällt der Kininogenspiegel in den ersten 2,5 Stunden signifikant ab ($p < 0,001$), ist bis zur 8. Stunde noch erniedrigt (Signifikanz: $0,02 > p > 0,01$), durchsteigt dann den Normalbereich und ist ab der 25. Stunde signifikant ($p < 0,001$) erhöht. Noch nach 20 Tagen war ein signifikanter Anstieg ($p < 0,001$) des Kininospiegels zu messen.

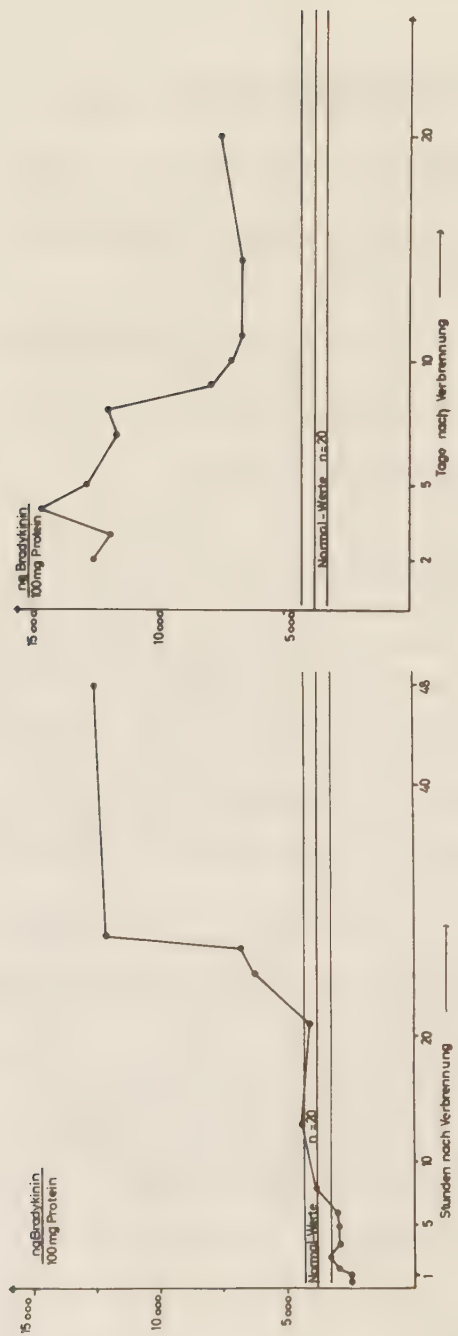


Abb. 6 KININOGENGEHALT (IN ng FREISETZBAREM BRADYKININ/100 mg PROTEIN) IM PLASMA VON RATTEN NACH VERBRÜHUNGSSCHOCK

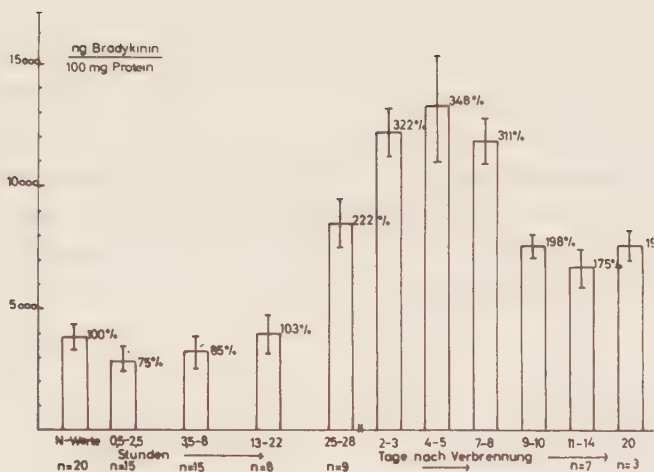


Abb. 7 KININOGENGEHALT (IN ng FREISETZBAREM BRADYKININ PRO 100 mg PROTEIN) IM PLASMA VON RATTEN NACH VERBRÜHUNG

2.2 Proteingehalt im Plasma

Nach der Biuretmethode betrug der Proteingehalt im Plasma von unbehandelten Ratten

$$6,26 \pm 0,17 \text{ mg/100 ml.}$$

Der Proteingehalt bei verbrühten Tieren fiel am ersten Tag bis zu 5,3 mg/100 ml Plasma ab, stieg dann langsam wieder an und hatte nach 14 Tagen noch einen deutlich verminderten Wert von 5,9 mg/100 ml Plasma.

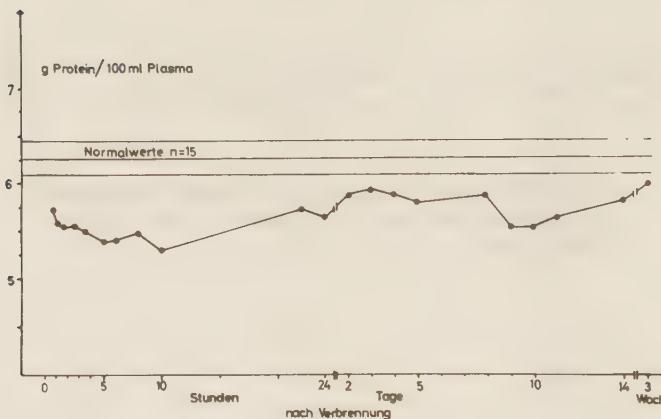


Abb. 8 GESAMTEIWEISSGEHALT IM PLASMA VON RATTEN NACH VERBRÜHUNG

$$\equiv = \bar{x} \pm s \text{ bei gesunden Ratten}$$

2.3 Elektrophorese

Bei der elektrophoretischen Auftrennung der Plasmaproteine ergab sich in den ersten 5 Stunden eine signifikante Verminderung der α_2 -Globuline ($p < 0,005$), siehe Abb. 9, nach 27 Stunden, dem Zeitpunkt der Kininogenvermehrung, eine signifikante Albuminverminderung ($p < 0,005$) sowie eine signifikante Erhöhung der α_2 -Globuline ($p < 0,001$).

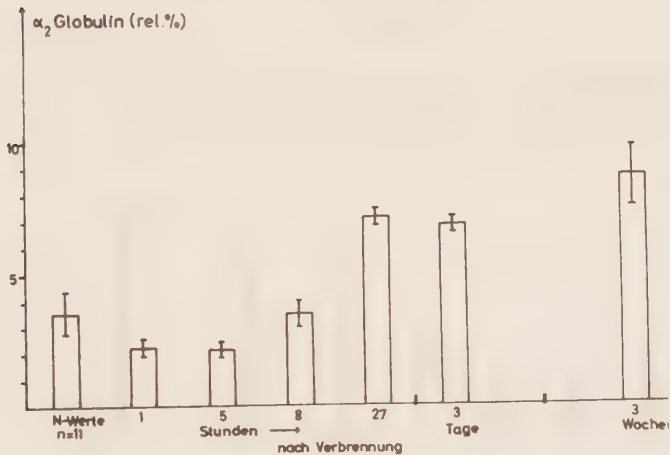


Abb. 9 α_2 -GLOBULIN (IN REL. %) IM PLASMA NACH VERBRENNUNG

Nach 3 Wochen hat sich der Anstieg des α_2 -Globulins und der Abfall des Albumins noch verstärkt (für beide Parameter Signifikanz: $p < 0,001$).

Der zeitliche Verlauf der α_2 -Globuline und der Kininogewerte weisen einen beinahe parallelen Abfall und Anstieg auf (Abb. 10).

Die Veränderungen des Kininogenspiegels korrelieren mit den Veränderungen des α_2 -Globulins und des Albumins (Abb. 11, 12).

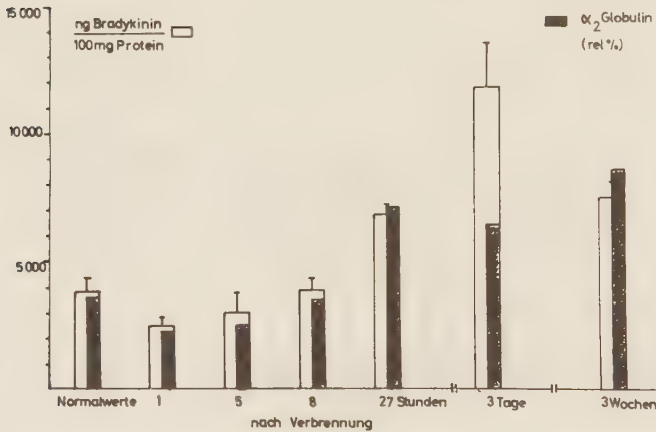


Abb. 10  KININOGENGEHALT (IN ng FREISETZBAREM BRADYKININ PRO 100 mg PROTEIN)
 α_2 -GLOBULIN IM PLASMA VON RATTEN NACH VERBRÜHUNG

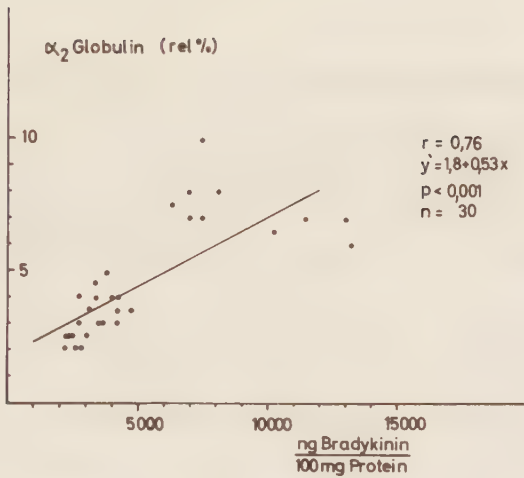


Abb. 11 KORRELATION ZWISCHEN KININOGEN (IN ng FREISETZBAREM BRADYKININ/100 mg PROTEIN) UND α_2 -GLOBULIN (REL. %) IM PLASMA VON VERBRÜHTEN RATTEN

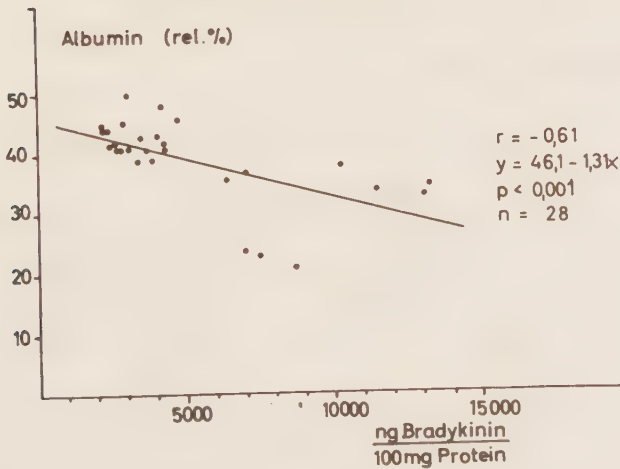


Abb. 12 KORRELATION ZWISCHEN KININOGEN (IN ng FREISETZBAREM BRADYKININ/100 mg PROTEIN) UND ALBUMIN (REL. %) IM PLASMA VON VERBRÜHTEN RATTEN

2.4 Kallikreinausscheidung im Harn

Die Harnausscheidung der Ratten schwankt sehr stark, von 0,5 ml/24 Stunden bis zu 28 ml/24 Stunden. In den ersten 24 Stunden nach dem Hitzeschock ist die Harnmenge gegenüber den Kontrolltieren stark vermindert, sie fällt auf über die Hälfte ab.

Harnausscheidung am ersten Tag nach der Verbrennung:

Versuchstiere MW 4,75 ml/24 Stunden/Ratte

Kontrolltiere MW 13,02 ml/24 Stunden/Ratte

Am nächsten Tag setzte bei den verbrühten Tieren eine überschießende Harnausscheidung ein, am dritten Tag nach dem Versuch hatte sich die durchschnittliche Harnausscheidung von Versuchs- und Kontrolltieren wieder angeglichen.

Kallikreinausscheidung:

1. Tag 4529 $\pm$ 1938 mU/24 Stunden/Ratte n = 14

2. Tag 4681 $\pm$ 1844 mU/24 Stunden/Ratte n = 14

Verbrühung:

Versuchstiere n = 5: Kontrolltiere n = 5:

3. Tag 871 $\pm$ 286 mU/24 Std 3202 $\pm$ 1192 mU/24 Std.

4. Tag 3526 $\pm$ 1146 mU/24 Std 2388 $\pm$ 1242 mU/24 Std.

5. Tag 2883 $\pm$ 1821 mU/24 Std 2279 $\pm$ 416 mU/24 Std.

Im 24-Stundenurin nach dem Schock sank die Kallikreinausscheidung signifikant auf 871 $\pm$ 286 mU/Ratte ($p < 0,001$) ab und stieg in den folgenden 24 Stunden wieder auf 3626 $\pm$ 1146 mU pro Ratte an. Bei den Kontrolltieren ergab sich eine nicht signifikante Verringerung der täglichen Harnkallikreinausscheidung gegenüber den Tagen vor der Scheinbehandlung bis zum Eintauchen ins Wasser.

Nach der Verbrühung sank nicht nur die Kallikreinausscheidung pro 24 Stunden, auch die Konzentration pro ml Urin war erniedrigt. Während vor dem Schock die durchschnittliche Konzentration 760 ± 329 mU/ml Urin betrug, sank sie bei den verbrühten Tieren am

1. Tag auf 197 ± 68 mU/ml Urin
2. Tag auf 229 ± 70 mU/ml Urin
3. Tag auf 326 ± 64 mU/ml Urin.

Auch bei den Kontrolltieren sank die Konzentration am ersten Tag nach der Scheinmanipulation auf 267 ± 102 mU/ml, stieg aber schon am nächsten Tag in den Bereich der Norm, auf 523 ± 62 mU/ml Urin.

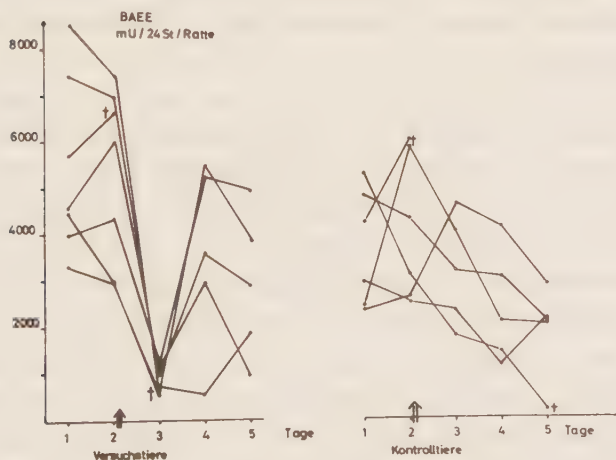


Abb. 13 KALLIKREINAUSSCHIEDUNG (GEMESSEN ALS ESTEROLYTISCHE SPALTUNG VON BAEE) IM URIN VON RATTEN (IN mU PRO 24 STUNDEN PRO RATTE) VOR UND NACH VERBRÜHUNG

C. DISKUSSION

1. Zur Methode

Die Komponenten des Kallikrein-Kininsystems befinden sich in einem Zustand der latenten Aktivierung, deren Grad von physiologischen oder pathophysiologischen Prozessen abhängig ist. Zur Frage der Beteiligung der Komponenten des Systems an den pathophysiologischen Vorgängen nach Hitzeschock beschränkten wir uns auf die Bestimmung des Substrates der Kinine, des Plasmakininogens und des Harnkallikreins. Eine direkte Erfassung des Blutkininspiegels ist durch die schnelle Inaktivierung durch Kininasen sehr erschwert, doch läßt die wiederholte Bestimmung des Plasmakininogenspiegels nach Hitzeschock u.a. Rückschlüsse auf eine veränderte Plasmakininkonzentration zu.

Die aus dem Kininogen in vitro freigelegten Kinine können radioimmunologisch oder am Bioassay bestimmt werden. Empfindlichkeit (bis zu 25 pg, 28) und Spezifität sind beim Radioimmunoassay zwar größer als beim Bioassay, andererseits mißt man mit dem Radioimmunoassay antigene Gruppen, bei denen auch immunologisch wirksame Spaltprodukte erfaßt werden können (72). Für biologisch wirksame Substanzen wie die Kinine ist deshalb der Bioassay schwer zu ersetzen.

Der individuelle Kininogengehalt der einzelnen Tiere ist sehr unterschiedlich. Die relativ hohen Schwankungen der Kininogenspiegel waren also nicht methodisch bedingt. In den von uns gewählten Anordnungen lag der Variationskoeffizient V_r bei 3,5 %, dies entspricht einer Präzision, die in den Bereich radioimmunologischer Bestimmungen reicht.

Als Bioassay verwendeten wir den Rattenuterus im Oestrus, wobei nach GADDUM (73) eine Ovariectomie nicht erforderlich erschien. ROCHA E SILVA und andere Autoren verwendeten das Meerschweinchenileum. Andere getestete Muskelpräparationen sind das Rattenduodenum (74), Katzenjejunum (75), Kaninchenduodenum (76). Bei vergleichenden Untersuchungen erwies sich jedoch der Rattenuterus als die Muskelpräparation mit der besten Reproduzierbarkeit und größten Empfindlichkeit.

Ein Nachteil der Kininogenbestimmung in der beschriebenen Weise könnte in der Bildung von potenzierenden Peptiden neben Bradykinin liegen (77, 78, 79). Diese können durch Chromatographie des Hydrolysates am Ionenaustauscher Amberlite CG 50 (77) abgetrennt werden. Bei den hier durchgeführten serienmäßigen Versuchen erwies sich aber bei einer chromatographischen Aufarbeitung die Ausbeute an wiedergefundenem Bradykinin als gering (50-70 %), die Reproduzierbarkeit war schlecht. Außerdem waren nicht die absoluten Werte von Bedeutung, sondern die Veränderungen im Vergleich zu unter denselben Bedingungen ausgetesteten Normalwerten.

Der Rattenuterus reagiert auf Kallidin schwächer als auf Bradykinin (27). Bei der Verwendung von synthetischem Bradykinin als Standard wird also vorausgesetzt, daß in der Inkubationslösung nicht alle Kinine, sondern nur Bradykinin vorliegt. WEBSTER und PIERCE (80) erhielten bei Inkubation von menschlichem Plasma mit Trypsin nur 2,5 % der pharmakologischen Aktivität als Kallidin, Versuche von HABERMANN und MÜLLER (81) bestätigten dies. Die geringe Menge freigesetzten Kallidins erlaubte also die Verwendung von Bradykinin als Vergleichssubstanz.

2. Zu den Ergebnissen

Veränderungen des Gesamtkininogengehalts im Plasma sind bei unterschiedlichen pathologischen Zuständen wie Entzündungen (82), Strahlenbelastung (83), Hitzeschäden (84), Gewebeschäden (85), verschiedenen Schockformen wie septischer Schock beim Menschen (47), posttraumatischer Schock, anaphylaktischer Schock am Meerschweinchen, Kollidonschock an Hunden, Dextran- und Wärmeschock an Ratten beschrieben worden (86).

Diese Veränderungen im Kininogengehalt können aber nur dann als eventuelle Beteiligung des Kininsystems an den pathophysiologischen Prozessen gedeutet werden, wenn keine Änderungen im Gesamtproteingehalt erfolgen. Mit diesem Einwand konnte HABERMANN (87) einige wahrscheinlich gemachte Beteiligungen des Kininsystems widerlegen. Die hier ermittelten Werte wurden auf 100 mg Gesamteiweiß bezogen, so daß ein von der Proteinkonzentration unabhängiger Vergleich der Werte möglich war.

Die Ergebnisse zeigen, daß in den ersten Stunden nach dem Verbrennungsschock ein signifikanter Abfall des Kallikreinsubstrates im Plasma erfolgt, nach zwei Tagen von einem Anstieg bis auf den dreifachen Normalwert gefolgt. GREEF (86) beschrieb beim Wärmeschock der Ratten und den übrigen Schockformen ebenfalls einen signifikanten Kininogenabfall. ERDÖS und NAKAJIMA (47) fanden beim septischen Schock des Menschen einen Abfall des Kallikreinsubstrates bis auf Null, allerdings wurde hier das Plasma mit durch Ins-HF aktiviertem Plasmakallikrein umgesetzt. DINIZ und CARVALHO (88) konnten beim hämorrhagischen Schock ein Ansteigen des Kininogens beobachten.

Veränderungen des Kininogenspiegels können nach HABERMANN (89) eine positive oder negative Deutung erfahren, d.h. ein Abfall kann auf einem vermehrten Verbrauch durch erhöhte Bildung von Kininen oder aber einem enzymatischen Abbau ohne Kininfreilegung und einem Mißverhältnis zwischen Kininogenbildung und -abbau beruhen.

Für eine positive Deutung spricht beim Verbrennungsschock die gesteigerte Enzymfreisetzung aus den zerstörten Zellen und die Bildung von Peptidfragmenten. Es kann zur Aktivierung von Kallikrein und Hagemannfaktor und damit zu Kininfreisetzung und Substratverbrauch kommen. Man vermutet auch eine "feedback function" des Kallikreins, das seinerseits bei Oberflächenkontakt, also Trauma, den Hagemannfaktor aktiviert und die Enzymkaskade in Gang setzt (90). Die stark ansteigende Kapillarpermeabilität und der damit verbundene Austritt von Plasma ins Gewebe bewirkt eine Oberflächenaktivierung des Plasmakallikrein-Kininsystems. Die im Schock erhöhte AdrenalinKonzentration könnte ebenfalls den erniedrigten Kininogenspiegel bedingen, da in den Mastzellen der Ratte eine durch Adrenalin stimulierbare Kininogenase nachgewiesen wurde (91).

Erweiterte Venolen und starker Blutdruckabfall im Schock lassen sich neben anderen Mechanismen ebenfalls mit einer erhöhten Kininfreisetzung in Einklang bringen

Die Ergebnisse zeigen einen steilen Kininogenanstieg nach 28 Stunden. Bei maximaler Syntheserate der Leber dauert es nach Erniedrigung des Kininogengehalts durch Chymotrypsin (89) mindestens 12, wahrscheinlich über 24 Stunden, bis der Ausgangswert wieder erreicht ist. Trauma, lokale Entzündungen und andere Stimuli führen zu einer Erhöhung bestimmter Plasmaproteine, darunter Kininogen, die als "Akute Plasma Reactants" bezeichnet werden (92). Die gefundene Erhöhung des Kininogenspiegels nach 28 Stunden kann als Reaktion der Leber auf das stimulierende Trauma gedeutet werden.

Nach dieser Zeit sind auch die entzündlichen Reaktionen am Ort der Verbrennung stark ausgeprägt. Anzeichen dafür sind die α_2 -Globulinvermehrung sowie die Albuminverminderung. Der gleichzeitige Anstieg des α_2 -Globulins und Kininogengehalts im Plasma und die Abnahme des Albumins deuten auf einen Zusammenhang zwischen den bei Gewebsverletzungen ablaufenden Abwehr- und Restitutionsprozessen und dem Kininsystem hin. Untersuchungen anderer Autoren (82) über eine gesteigerte Aktivität des Kininsystems am Ort der entzündlichen Reaktion ergaben einen Anstieg der "Kinin forming activity" und eine erhöhte Kininaseaktivität (93). Kininogenerhöhungen wurden auch nach entzündlichen Gewebsschäden durch Crotonöl und -Essigsäure sowie nach kombinierten Gewebs- und Strahlenschäden festgestellt (85, 83).

Bei den Versuchstieren lag nach drei Wochen der Kininogengehalt des Plasmas noch signifikant über dem Normalwert, ein Hinweis auf das Andauern der lokalen Entzündung und damit Stimulation der Kininogensynthese. Die Zunahme des Kallikreinsubstrates kann zu einer Vermehrung freier Kinine führen und so zur Ausbildung der Entzündungszeichen beitragen.

Eine der wichtigsten Reaktionen auf das Schockgeschehen ist die veränderte Nierenfunktion. MENG und LOEW konnten mit einem ähnlichen Schockmodell wie dem hier verwendeten nachweisen, daß die glomeruläre Filtrationsrate in der akuten Schockphase auf 35 % des Normalwertes absinkt und so die Hauptursache der am ersten Tag gefundenen Olig- oder Anurie ist (94).

Der erniedrigte Harnkallikreingehalt nach der Verbrennung ist eventuell ein wichtiger Parameter für eine Störung an den Tubuli. E. WERLE konnte zeigen, daß bei Homo- und Heterotransplantationen der Niere durch Abwehrmechanismen des Empfängers die Nierentubuli zerstört werden und das Absinken der täglichen Kallikreinausscheidung im Harn ein vorzeitiger Hinweis auf eine Nierenschädigung ist (95). Durch selektive Schädigung der proximalen Nierentubuli bei Ratten durch Salyrgan^R und Uranylacetat konnten WERLE und VOGEL ein Absinken der täglichen Harnkallikreinausscheidung herbeiführen. Aus diesen Untersuchungen (96) ist der Ort der Synthese des Harnkallikreins in der Tubuli anzunehmen. Unveröffentlichte Ergebnisse aus unserem Arbeitskreis weisen allerdings auf eine Synthese in Tubuli und Glomeruli hin (97).

Die am ersten Tag signifikant erniedrigte Harnkallikreinausscheidung könnte auf eine vorübergehende Schädigung der Tubuli und damit auf eine verminderte Syntheserate schließen lassen. Inwieweit die Ausscheidung von Kallikreininhibitoren durch die geschädigten Glomeruli in den Urin eine verminderte Ausscheidung von Urinkallikrein nur vortäuscht, läßt sich durch chromatographische Aufarbeitung des Urins nachweisen. PORCELLI und CROXATTO konnten in Urinproben, die nativ kein Urinkallikrein enthielten, nach chromatographischer Abtrennung des Inhibitors sehr wohl Kallikrein bestimmen (98).

ZUSAMMENFASSUNG

Meßvorrichtung und Testlösung zur biologischen Kininogenbestimmung am Rattenuterus wurden in den Einzelschritten überprüft und teilweise modifiziert.

In den gewählten Anordnungen lag der Variationskoeffizient der Methode bei $V_r = 3,5 \%$, eine Unterscheidung von $0,2 \text{ ng}$ Bradykinin war bei entsprechender Uterusempfindlichkeit möglich.

Etwa 120 Ratten wurden nach einem standardisierten Verfahren verbrüht und im Plasma der Kininogengehalt mit dem Bioassay am Rattenuterus bestimmt. Ferner wurden der Proteingehalt des Plasmas, die elektrophoretische Auftrennung der Plasmaproteine und der Harnkalkreingehalt gemessen.

In der Schockphase nach der Verbrühung sank der Kininogengehalt signifikant ab, nach 28 Stunden zeigte sich ein steiler Anstieg bis zum Vierfachen des Normwertes und noch nach 21 Tagen lag der Kininogenspiegel signifikant über dem Normwert. Die Veränderungen lassen auf eine erhöhte Bildung von Kininen sowie eine vermehrte Kininogenbildung als Reaktion auf das stimulierende Trauma schließen.

Die Veränderungen des Kininogenspiegels korrelieren mit den Veränderungen des α_2 -Globulins und des Albumins.

Im Urin der Ratten sank am ersten Tag nach der Verbrühung die Kalikreinausscheidung signifikant ab. Dies kann als Hinweis für eine Tubulischädigung betrachtet werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Frey, E.K.:
Arch. klin. Chir. 142, 663 (1926)
- (2) Kraut, H., Werle, E.:
Hoppe Seylers Z. physiol. Chemie 189, 97 (1930)
- (3) Werle, E., Roden, P. von:
Biochem. Z. 286, 213-219 (1936)
- (4) Werle, E.:
Biochem. Z. 287, 235 (1936)
- (5) Werle, E., Götze, W., Keppler, A.:
Biochem. Z. 289, 217 (1937)
- (6) Rocha e Silva, M., Beraldo, W. T., Rosenfeld, G.:
Ann. J. Physiol. 156, 261-733 (1949)
- (7) Elliot, D.F., Lewis, G. P., Smyth, D. G.:
Biochem J. 87, 21 (1963)
- (8) Fiedler, F., Werle, E.:
Hoppe-Seylers Z. phys. Chemie 348, 1087 (1967)
- (9) = 3
- (10) Fox, R. H., Hilton, S. M.:
J. Physiol. 142, 219-32 (1958)
- (11) Lewis, G. P.:
J. Physiol. 147, 458-68, 1959
- (12) Werle, E., Vogel, R.:
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 131, 257-61 (1961)
- (13) Habermann, E., Klett, W.:
Biochem. Z. 346, 133-58 (1966)

- (14) Komya, M., Kato, H., Suzuki, T.:
J. Biochem. 76, 811-22 (1974)
- (15) Komya, M., Kato, H., Suzuki, T.:
J. Biochem. 76, 823-32 (1974)
- (16) Komya, M., Kato, H., Suzuki, T.:
J. Biochem. 76, 833-45 (1974)
- (17) Seidel, G.:
Agents and Actions, vol. 3/1 (1973)
- (18) Jacobsen, S.:
Br. J. Pharmac. Chemoth. 28, 64-72 (1966)
- (19) Spragg, J., Austen, F.K.:
Biochem. Pharmac. Vol. 23 781-91, Pergamon Press, 1974
- (20) Jano, M., Nagasana, S., Suzuki, T.:
Biochem. J. 69, 471-81 (1971)
- (21) Briseid, Venneröd, A. M., Andrew, E.:
Acta pharmacol. et toxicol., 32, 193-204 (1973)
- (22) Jacobsen, S., Kriz, M.:
Brit. J. of Pharmac. a. Chemoth., vol. 29, Nr. 1, p. 25
(1967)
- (23) Jacobsen, S.:
Brit. J. of Pharm. a. Chemoth., vol. 26, Nr. 2, p. 403
(1966)
- (24) Habal, T. M., Movat, H. Z., Burrowes, C. E.:
Biochem. Pharmac., vol. 23, 2291-2303, Pergamon Press (1974)
- (25) Habermann, E.:
Biochem. Z. 337, 440 (1963)

- (26) Werle, E., Zach, P.:
Z. klin. Chem. u. Biochem., 8. Jg., S. 186-189 (1970)
- (27) Rocha e Silva, M.:
Life Sciences Vol. 15, 7-22, Pergamon Press (1974)
- (28) Mashford, M. L., Roberts, M. L., University of Melbourne,
Parkeville, Australia
- (29) Ferreire, S. H., Vane, J. R.:
Brit. J. Pharm. 30, 417-24 (1967)
- (30) Roblero, J., Prado, E. S., Freitas, J. O., Pavia, Ac. M.:
Abstracts, Symposion on Chemistry and Biology of the
Kallikrein-Kininsystem in Health and Disease, Reston,
Virginia, USA, 20.-23. Okt. 1974
- (31) Austen, F. K., siehe (30)
- (32) Lewis, G.P.:
Ann. N. y. Acad. Si. 116, 847 (1964)
- (33) Lewis, G. P.:
Handbook of Experiment. Pharmacol. Bd. 25, S. 516,
Springer 1970
- (34) Bishop, J. M., Harris, P., Segel, N.:
Brit. J. Pharmacol. 25, 456-69 (1965)
- (35) Holdstock, P. J., Mathias, A. P., Schachter, M.:
Brit. J. Pharmac. 12, 149-58 (1957)
- (36) Keele, C. A.:
Proc. Roy. Soc. Ser. B. 173, 361-69 (1969)
- (37) Lewis, G. P., Feldberg:
J. Physiolog. 178, 239 (1965)

- (38) Werle, E.:
Münchn. Med. Wochenschr., 115, Jg. Nr. 7, 225-30 (1973)
- (39) Moriwaki, Ch.:
Symposion: Kallikrein-Physiological properties and pharmacological rational, Mainz, 18.-19. Nov. 1972
- (40) Mehnon, K. L., Line, M. J., Hughes, T., Nies, As.:
J. clin. Invest. 47, 1295 (1968)
- (41) Margolius, H. S.:
Siehe 30, 1974
- (42) Aaron, R. K.:
Siehe 30, 1974
- (43) Katori, Makoto, Nagaoka:
Siehe 30, 1974
- (44) Vates, J. A., Melmon, K. L.:
Hypotensive Peptides, 565-75, Springer Verlag (1966)
- (45) Melmon, K. L., Webster, M. E., Goldfinger, J. E., Seegmiller, J. E.:
Arthritis Rheumat. 10, 13-20 (1967)
- (46) Brocklehurst, W. E., Zeitlin, I. J.:
J. Physiolog., London, 192, 417-26 (1967)
- (47) Nakajima, T., Hirsch, E. F., Oshima, G., Merman, C. M., Erdös, G. E.:
Siehe 30, 1974
- (48) Stone, H. H. et al.:
Respiratory burns, 165, 157 (1967)
- (49) Arturson, G.:
Acta chir. Scandinav. Supp. 274, 1 (1961)

- (50) Wolff, W. A.:
Ann. Surg. 112, 158 (1947)
- (51) Davis, J. H., Abbott, W. E.:
Surgery 40, 788 (1956)
- (52) Loew, D., Meng, K.:
Langenbecks Arch. Chir. 335, 321-30 (1974)
- (53) Crunkhorn, P., Wills, A. L.:
Brit. J. Pharm. 41, 49 (1971)
- (54) Schneider, M.:
Dtsch. Med. Journ. 18, 401 (1967)
- (55) Nemir, M. D.:
Studies on the humoral factor in pulmonary embolism.
- (56) Talamo, R. C.:
Siehe 30, 1974
- (57) Greenbaum, Yamafuji:
International Symposium on Vasoaktive polypeptides,
Sao Pulo, 1966
- (58) Diniz, C. R., Carvalho, J. F., Ryan, J., Rocha e Silva, M.:
Nature 192, 1194 (1961)
- (59) Weichselbaum, T. E.:
Americ. J. Chir. Path. (Techn. Sect.) 10, 40 (1946)
- (60) Trautschold, J., Werle, E.:
Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chemie, S. 48, 1961
- (61) Heutelbach, H.:
Dissertation, Med. Fak. München (1971)
- (62) Brovho, J. W., Evans, E. J., Harm, W. T., Reid, J. D.:
Am. Surg. 136, 535-45 (1952)

- (63) Grisola, A., Forrest, W. F., Peltier, J.:
J. Trauma, 3, 259-64 (1963)
- (64) Pears, H., Kingsley, H. D.:
Surg. Gynec. Obstet. 98, 385-94 (1954)
- (65) Mc. Carthy, M. D., Lewis, J. R.:
J. Lab. Clin. Med. 30, 1027 (1945)
- (66) Arturson, G.:
Acta path. et microbiol. scandinav. 61, 353-64 (1965)
- (67) Keele, C. A., Armstrong, D.:
Substances producing Pain and itch, Edward Arnold (publ.)
Ltd., London (1964)
- (68) Greenbaum, L. M., Yamafuji, K., Hosado, T.:
Biochem. Pharmac. 15, 31 (1966)
- (69) Croxatto, H.:
Persönliche Mitteilung
- (70) Sachs, L.:
Angewandte Statistik, S. 65, Springer Verlag (1974)
- (71) Vogel, R., Trautschold, I., Werle, E.:
Natürliche Proteinaseinhibitoren, Thiemeverlag (1966)
- (72) Chayen, J.:
21. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, München 1975
- (73) Gaddum, J. H., Hameed, K. A.:
Brit. J. Pharmacol. 9, 240 (1954)
- (74) Ferreire, S. H., Vane, J. R.:
Brit. J. Pharmac. 30, 417 (1967)

- (75) Ersparmer, V., Ersparmer, F.:
Brit. J. Pharmac. 19, 337 (1961)
- (76) Garbe, G., Vogt, W.:
Naunyn-Schmiedeberg. Arch. exp. Path. Pharmac., 256,
119 (1967)
- (77) Aarsen, P. N.:
Brit. Pharmac. 32, 453 (1961)
- (78) Hamberg, U.:
Ann. Chir. Gynaec. Fenn. 61, 238 (1972)
- (79) Louhija, A., Sipilä, R.:
Biochem. Pharmacol. 21, 1151 (1972)
- (80) Webster, M. E., Pierce, J. V.:
J. Pharmacol. exp. Ther. 130, 484 (1960)
- (81) Habermann, E., Müller, B.:
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac. 253, 464
(1966)
- (82) Edery, H., Lewis, G. H.:
J. Physiol. (Lond.) 169, 569-83, (1963)
- (83) Reichenbach-Klinik, K-E., Werle, E., Henneberg, R.,
Messerschmidt, O.:
Strahlentherapie Nr. 6, 148, 619-23 (1974)
- (84) Lewis, G. P., Wawretschek, W. A.
- (85) Zach, H. P., Werle, E., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm. 276,
167-180 (1973)
- (86) Greef, K.:
Neue Aspekte der Trasyloltherapie, S. 135, Schattauer 1966

- (87) Habermann, E., Sailer, F., Müller, J.:
Schock, Stoffwechselveränderungen und Therapie,
Schattauerverlag, S 271
- (88) Diniz, C. R., Carvalho, I. F.:
Ann. N. Y. Acad. Sci. 104, 77 (1963)
- (89) Habermann, E.:
Probleme der Pathophysiologie des Kininsystems
- (90) Allen P. Kaplan:
Siehe 30 (1974)
- (91) Rothschild, A. M., Castania, A., Crdeiro, R. B.:
Siehe 30
- (92) Borges, R., Gordon, A. H.:
Siehe 30 (1975)
- (93) Geese, A., Lonovics, J., Zsilinszky, E., Szekeres, L.:
V. Internation. Congress on Pharmacology, Abstracts,
79, San Francisco, 1972
- (94) Meng, K., Loew, D.:
Langenbecks. Arch. Chir. 333, 245-55 (1974)
- (95) Werle, E., Busse, R., Schmal, A.:
Klin. Wschr. 46, 1315 (1968)
- (96) Werle, E., Vogel, R.:
Arch. int. Pharmacodyn. 126, 171 (1960)
- (97) Mann, K.:
Unveröffentlicht
- (98) Porcelli, G.:
Croxatto, R. H.:
Siehe 30 (1974)

DANKSAGUNG

Für die freundliche Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie für die hilfreichen Anregungen zur Durchführung der Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle, der kurz vor Abschluß der Arbeit verstorben ist.

Herr Prof. Dr. H. Fritz erklärte sich dankenswerterweise bereit, die weitere Betreuung der Arbeit zu übernehmen.

Herrn Dr. K. Mann möchte ich für die ideenreiche Unterstützung bei Ausführung der Untersuchungen und Auswertung der Ergebnisse meinen herzlichen Dank aussprechen.

LEBENS LAUF

Am 25.6.1943 wurde ich als Tochter des Rechtsanwalts Friedrich Zacherl und seiner Ehefrau Rose, geb. FÜß, in München geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in München trat ich 1953 in die St. Anna-Oberrealschule in München ein und legte hier im Juni 1962 das Abitur ab.

Im Okt. 1962 begann ich die Praktikantenzeit für Apotheker in der Pettenkoferapotheke, München, die ich im Okt. 1964 mit dem Vorexamen abschloß.

Im Wintersemester 1964/65 begann ich an der Universität München das Pharmaziestudium, im Mai 1968 legte ich hier das pharmazeutische Staatsexamen ab.

Im Nov. 1969 erhielt ich die Approbation als Apothekerin.

Nach Tätigkeit in verschiedenen Apotheken begann ich im Sommersemester 1971 das Medizinstudium an der Universität München. Im Okt. 1972 bestand ich hier die ärztliche Vorprüfung.

Das medizinische Staatsexamen werde ich ab Sept. 1975 an der Universität München ablegen.

